

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04416

研究課題名(和文) MicroRNA依存性の歯周組織の老化機構の解明と時間制御に基づいた治療法の開発

研究課題名(英文) Development of time controlled therapy for aged periodontal tissue.

研究代表者

山下 元三 (YAMASHITA, MOTOZO)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：90524984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、加齢に伴う歯周組織老化の慢性炎症病態に至るプロセスを解明するために、時間軸に沿った遺伝子ネットワーク変動のダイナミクスとして俯瞰した。その際に、エピジェネティックな変異が集積している老化歯根膜細胞に着目し、miRNAsによる細胞老化の制御機構を、炎症性応答、ミトコンドリア機能、幹細胞能、エクソソームといった多様な細胞機能について分子レベルで解明した。そして、老化歯根膜細胞においては、ECM産生、ミトコンドリア機能、核膜に特徴的な変化が生じていること、その原因の一つとして、老化歯根膜細胞に特異的なmiRNAs-mRNAによる制御機構を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、加齢とともに進行する歯周組織の老化性の慢性炎症の病態の一部が分子レベルで明らかとなった。新規のトランスオミクス解析によるアプローチにより、miRNAsによる細胞老化の制御機構が、細胞代謝、炎症性応答、ミトコンドリア機能、幹細胞能、エクソソームといった老化歯根膜細胞の多様な細胞機能を調節制御していることが示唆された。今後、得られた分子基盤情報を用いて、歯周組織の老化性の慢性炎症病態を「遺伝子細胞組織個体レベル」で検証することで、高齢者の難治の歯周病の病態マーカーの探索、新規の診断、予防法の樹立が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the dynamics of gene networks along the time axis to clarify the aging processes leading to the chronic inflammation in periodontal tissue. We focused on senescent periodontal ligament cells with epigenetic mutations, and elucidated the regulatory mechanism of cellular senescence by miRNAs, focusing on various cellular functions such as inflammatory response, mitochondrial function, stem cell, and exosome. We found that senescent periodontal ligament cells showed the age dependent characteristic in ECM production, mitochondrial function, and nuclear membrane, which are regulated by senescent periodontal ligament specific miRNAs-mRNAs mechanisms.

研究分野：歯周病

キーワード：老化 細胞老化 マイクロRNA 歯根膜細胞 慢性炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢と共に進行する個体の生物学的老化は、臓器の器質的変化を伴う機能低下を特徴としている。実際に、糖尿病や冠動脈疾患、メタボリックシンドロームなどの加齢性の代謝性疾患においては、原因となる肝臓や血管組織において臓器の機能低下が認められる。近年、老化細胞が臓器に蓄積し、炎症性サイトカイン、細胞外基質分解酵素、機能性 RNA 分子を含むエクソソームを分泌することで慢性炎症や発ガンなどの病態形成に関与することが明らかとなってきた。歯周病は、細菌バイオフィルムを直接の原因とするものの、環境と宿主の相互の影響を大きく受け歯周組織の炎症と破壊が進行する疾患である。歯周組織は、消化管へとつながる第一関門である口腔において、歯周病原性細菌、メカニカルストレス、活性酸素種(ROS)などの老化誘導刺激となる環境ストレスに絶えず暴露されている。よって、これら環境ストレスの蓄積がエピジェネティックな変異を歯周組織のゲノム DNA に惹起し、細胞レベルの老化、すなわち「細胞老化」が誘導されることで、歯周組織の臓器レベルの老化が生ずることが推察された。そこで私たちは、「老化した歯周組織構成細胞が、高齢者の歯周病に特徴的な慢性炎症病態の病因となりうる」との老化細胞作業仮説に基づき、歯周組織における細胞老化の生理的役割に着目し、研究を実施してきた。ヒト初代培養歯根膜細胞を用いた *in vitro* 老化誘導培養系の樹立に成功し、歯周組織幹細胞の加齢に伴う機能低下、ニッチ様細胞の TGF- β の産生を伴う炎症制御、老化歯根膜細胞のオートファジー低下や IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカイン、ケモカインなどの老化関連分泌(Senescence-Associated Secretory Phenotype: SASP)現象を報告している。これら一連の研究は、高齢者において歯周組織に老化細胞が存在する事、さらには歯周組織の老化を基礎病態とした歯周病重篤化の病因論強く示唆するものである。実際に、我々の日常臨床において、細菌バイオフィルムの除去を中心とした歯周治療のみでは高齢者は難治の臨床像をとることが多い。そこで、高齢者の難知性の歯周病態を解明するためには、加齢に伴う歯周組織の老化性炎症をよりよく理解することが必要と考えられた。

所属するグループでは、歯周炎患者のフルゲノム解析を実施し、ゲノムの未開領域である、MicroRNAs(miRNAs)の機能と重要性に注目している。実際にパイロットスタディーにおいて、幾つかの miRNAs は老化歯根膜細胞において発現が増加し、長寿遺伝子群への関係が推察された。よって、歯周組織の老化性の慢性炎症病態を「遺伝子—細胞—組織—個体レベル」で検証することにより、高齢者の難治の歯周病の病態マーカーの探索、新規の診断、予防法樹立への応用が十分可能であると推察された。また、細胞老化を標的とする miRNAs を基盤とした核酸医薬の開発により、高齢者の歯周組織を賦活化、若返りすることで、歯周病のみならず、共通の病態メカニズムを有する加齢性の成人性疾患に対する新規の治療法への展開も期待される。そこで本研究では、加齢に伴うエピジェネティックな変異が集積している「老化歯根膜細胞」の miRNAs に依存性の細胞老化の制御機構を、細胞代謝、炎症性応答、ミトコンドリア機能、幹細胞能、エクソソームの分泌機構といった多様な細胞機能に着目し分子レベルでの解明に取り組むこととした。すなわち、歯周組織老化のダイナミクスを時間軸に沿った遺伝子ネットワークの変動として俯瞰することで加齢とともに進行する慢性炎症病態確立に至るプロセスの全容を検討し、分子基盤情報の構築を目指すものである。そして、高齢者の歯周病に特有の病態生理を規定する細胞老化、慢性炎症のメカニズムを遺伝子レベルで明らかにすることが老化制御法の開発には必要と考えた。

2. 研究の目的

歯周病において、「加齢」は喫煙と並ぶ重要なリスク因子である。加齢に伴う生物学的老化の背景である臓器の機能低下には、細胞レベルの老化、「細胞老化」が関与しており、組織、臓器においてその数を増やした老化細胞は、炎症性サイトカイン、蛋白分解酵素の産生を介して慢性炎症を惹起することが明らかになっている。本研究では、エピジェネティックな機構により遺伝子の発現を制御する MicroRNA(miRNAs)に着目し、加齢に沿って進行する歯周組織の慢性炎症、いわゆるインフラメイジングと組織恒常性破綻の分子メカニズムの全容解明を試みる。得られた基盤情報に基づき、歯周組織の老化性炎症が高齢者の病態生理に及ぼす影響を検討し、細胞老化を標的とした新規の診断、治療法を開発のための分子基盤情報を構築することで、口腔から全身の健康寿命の延伸を目標とする。

3. 研究の方法

高齢者の歯周病病態の根幹をなす、老化歯根膜細胞の遺伝子発現データベースを加齢の時間軸に沿って構築し、歯周病の発症、進行過程における細胞老化の病態生理学的意義を miRNAs による遺伝子制御機構を中心に分析する。得られた分子情報に基づき、高齢者の歯周組織に特異的な miRNAs を同定し、老化病態の診断法樹立を目指す。また、細胞老化の制御に関連する miRNAs を同定し、「核酸治療薬」開発のシーズ探索に取り組む。

(1) 初代培養歯根膜細胞の *in vitro* 複製老化モデルを用いて、細胞老化の各ステージにおける miRNAs、mRNAs のトランスクリプトーム解析し、それぞれの階層をひもづけることで遺伝子発現のネットワーク分析を行う。そして、歯根膜特異的な細胞老化、炎症誘導、エネルギー、栄養代謝、幹細胞機能を制御する miRNAs 群の同定、老化エクソソーム中の miRNAs の同定を試みる。

(2) ヒト正常歯根膜細胞に、同定された老化歯根膜細胞特異的 miRNAs を模倣した合成 miRNAs を遺伝子導入し、炎症性サイトカインや細胞外基質生成に及ぼす影響を検討する。

(3) 歯周組織における miRNAs の生理作用を *in vivo* モデルで検証する為に、老齢マウスを用いた *Porphyromonas gingivalis* (P.g.)菌感染歯周炎モデルの歯周組織における老化歯根膜細胞、歯肉線維芽細胞の動態、miRNAs の発現を検討する。

(4) *In vitro* の実験ならびに動物実験モデルからは限定された環境要因下でのデータモデルとなる可能性があるため、歯周病により抜去された歯の歯根膜組織ならびに、唾液中のエクソソームに含まれる miRNAs や mRNAs の解析を実施し、加齢による老化、炎症の進行に沿ったヒトの病態バイオマーカー、治療標的遺伝子の実証的な検討を行う。

4. 研究成果

歯周組織構成細胞の時間軸に沿って進行する細胞の老化過程の各階層におけるトランスオミクス解析を行うことによって、細胞老化に特異的な miRNAs 群を同定した。初代歯周組織構成細胞の *in vitro* 複製老化プロセスを構築した。具体的には、老化細胞における miRNAs、mRNAs 発現のトランスクリプトーム解析、細胞構成蛋白質ならびに培養上清に分泌された炎症性 SASP 蛋白のプロテオーム解析を行い、それら各々のオミクスのネットワークについて階層解析いわゆる、トランスオミクス解析を行った。そして、歯根膜細胞の細胞老化の時系列(細胞継代数)について比較した多元階層からなるデータベースを構築し、miRNAs に制御された mRNAs、蛋白発現の歯周組織構成細胞の老化メカニズムの全容の解明にあたった。

(1)ならびに(3)

歯根膜細胞老化過程のトランスクリプトーム解析

・ヒト歯根膜細胞の *in vitro* 老化過程の誘導で樹立した歯根膜細胞において、時間軸の異なる継代数(P10, P20, P30, P40)サンプルの miRNA 発現プロファイルの解析をおこなった。miRNA を精製、標識化し、約 2000 種の miRNA の発現を比較、解析した。また、磁性マグネット精製法により、培養上清中のエクソソームを回収し、miRNA を精製し、RT-qPCR 法にて解析した。

・歯根膜細胞の *in vitro* 老化過程における mRNA の発現解析

miRNA を精製した老化歯根膜細胞と同じサンプルの total RNA 画分より mRNA を精製、ライブラリを調整し、次世代シーケンサー「Illumina HiSeq」による RNA シークエンスを実施した。P10, P20, P30 の歯根膜細胞の mRNAs プロファイルについては、GeneSpring ソフトにより検討した。2 倍以上の発現変動を認めた mRNAs を対象とした GO term 解析により、細胞分裂、核タンパク、DNA 修復、細胞外基質タンパクに関係する mRNAs 群の大きな変動が明らかとなった。細胞外基質関連タンパクに関係する遺伝子のうち、コラーゲンの生成、代謝に関する mRNAs が多く抽出されたことより、コラーゲン細繊維、3 次元構造維持に関係する遺伝子の pathway 解析を実施し、その相関図を作成した。

老化細胞に特徴的な SASP 蛋白である、IL-6、IL-8 を中心とした炎症サイトカインや接着分子の転写誘導に重要な NF- κ B, C/EBP β 経路を基準とした炎症シグナルのパスウェイを中心とするネットワーク解析により、老化、炎症制御、幹細胞能の中心となる miRNAs 群の絞り込みを行った。そして、歯根膜細胞を用いた機能解析により、老化歯根膜細胞の慢性炎症に特異な miRNA を同定した。現在、miRNAs についての論文を投稿中、作成中である。

老化歯根膜細胞の細胞画分、培養上清中に含有される分泌蛋白についてプロテオーム解析を行った。老化歯根膜細胞の蛋白質画分をショットガン質量分析の結果、細胞外基質を構成する蛋白の大きな変動が明らかとなった。プロテオーム解析と miRNAs—mRNAs 発現ネットワークを統合することで、加齢の時間軸に沿ったデータベースを構築した。老化性の炎症性蛋白質の産生や恒常性破綻に関連する因子を特定し、老化病態のマーカーとしての検証を行う予定である。今後、ヒト歯根膜細胞老化のデータをバイオサイエンスデータセンターにて登録公開する予定である。

(2) *in vivo* 小動物モデルを用いた歯周組織老化にはたす miRNAs の生理作用の解析

生体内での歯周組織の老化と慢性炎症における miRNAs の生理作用を検討する為に、老齢 C57BL/6 マウスに 5-0 絹糸を結紮することで歯周炎モデルを構築し、病態生理の解析を行った。老齢野生型マウス(C57/BL6)顎骨 μ CT 計測により、70 週齢において著明な歯槽骨の吸収と、歯周組織切片の SA- β GAL ならびに免疫組織学的解析により、ROS の蓄積、DNA ダメージの蓄積が観察された。また、外傷性咬合モデルマウスの歯周組織の mRNA 発現について RNA シークエンスを実施した。今後、絹糸除去の異なるタイムポイントの解析数を増やし、老齢個体の修復、治癒過程に及ぼす miRNAs の役割を検討予定である。

(4) 老化歯周組織と血清、唾液中における miRNAs と歯周病病態との関連性の解析

In vitro の実験ならびに動物実験モデルからは、ある特定の環境下でのデータモデルとなり、臨床病態としての老化、慢性炎症の病態を忠実には反映しない可能性がある。そこで、保存不可能

で抜去した歯に残存する歯周組織の解析を実施した。埋伏歯を用いた歯根膜組織中の老化細胞の病理組織学的な解析により、SA-βgal 染色が老化と炎症に関する病態バイオマーカーとして有用であることが明らかとなった。また、磁性マグネットを用いたエクソソームの精製が可能であり、エクソソーム中の miRNAs と微量な miR-155 は検出されるが、従来報告されている miR-146a の検出は困難であった。今後、臨床サンプルや評価方法の標準化の検討を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masumoto R., Kitagaki J., Matsumoto M., Miyauchi S., Fujihara C., Yamashita M., Yamada S., Kitamura M., Murakami S.	4. 巻 53
2. 論文標題 Effects of paraoxonase 1 on the cytodifferentiation and mineralization of periodontal ligament cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Periodontal Res.	6. 最初と最後の頁 200～209
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.12507	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 北垣次郎太、栢本梨沙、宮内静香、藤原千春、村上伸也	4. 巻 59
2. 論文標題 エクソームシークエンスによる日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本歯周病学会雑誌	6. 最初と最後の頁 P1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件／うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Mio SUZUKI, Motozo YAMASHITA, Kuniko IKEGAMI, Tomomi NAKAMURA, Koji MIKI, Manabu YANAGITA, Masahiro KITAMURA, Shinya MURAKAMI
2. 発表標題 Impairment of mitophagy in senescent HPDL cells.
3. 学会等名 96th General Session and Exhibition of the IADR（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kuniko Ikegami, Motozo Yamashita, Mio Suzuki, Arisa Nishikawa, Tomomi Nakamura, Koji Miki, Jirouta Kitagaki, Manabu Yanagita, Masahiro Kitamura and Shinya Murakami
2. 発表標題 Senescence-associated miR-34a accelerates periodontal stem-cell aging by targeting SATB2
3. 学会等名 American Academy of Periodontology (AAP) 104th Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motozo Yamashita, Mio Suzuki, Kuniko Ikegami, Tomomi Nakamura, Arisa Nishikawa, Koji Miki, Manabu Yanagita, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami
2. 発表標題 Optical dissection of the mitophagy dynamics in HPDL cells.
3. 学会等名 American Academy of Periodontology (AAP) 104th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下元三、鈴木美麻、池上久仁子、西川有梨沙、橋本康樹、柳田学、北村正博、村上伸也
2. 発表標題 老化歯根膜細胞におけるマイトファジーの機能解析
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mio Suzuki, Motozo Yamashita, Kuniko Ikegami, Tomomi Nakamura, Arisa Nishikawa, Kouki Hashimoto, Koji Miki, Manabu Yanagita, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami
2. 発表標題 Dissection of the mitophagy dynamics in HPDL cells by fluorescent probe.
3. 学会等名 第66回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motozo Yamashita
2. 発表標題 Analysis of cellular senescence in periodontal disease
3. 学会等名 THE 7TH JAPAN-THAILAND KOREA JOINT SYMPOSIUM (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 M Suzuki, M Yamashita, K Ikegami, T Nakamura, K Miki, M Yanagita, M Kitamura, S Murakami
2. 発表標題 Failure of mitophagy in senescent HPDL cells
3. 学会等名 第65回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会 JADR2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 K Ikegami
2. 発表標題 miR-34a inhibits osteoblastic differentiation of senescent HPDL by targeting SATB2
3. 学会等名 第65回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会 JADR2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池上 久仁子, 山下 元三, 鈴木 美麻, 三木 康史, 北垣 次郎太, 柳田 学, 北村 正博, 村上 伸也
2. 発表標題 ヒト老化歯根膜細胞におけるmicroRNA-34a-SATB2を介した硬組織形成制御
3. 学会等名 第38回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 榎本 梨沙, 北垣 次郎太, 松本 昌大, 宮内 静香, 小笹 匡雄, 東山 弥生, 竹立 匡秀, 藤原 千春, 山下 元三, 山田 聡, 北村 正博, 村上 伸也
2. 発表標題 ゲノムワイドアプローチを用いた日本人における侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索
3. 学会等名 第147回 歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山下 元三、鈴木 美麻、池上 久仁子、中村 友美、西川 有彩、北村 正博、村上 伸也
2. 発表標題 ヒト老化歯根膜細胞におけるマイトファジーの機能低下
3. 学会等名 第40回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 榎本 梨沙、北垣 次郎太、松本 昌大、宮内 静香、藤原 千春、黒田 智子、田内 拓史、小笹 匡雄、柏木 陽一郎、沢田 啓吾、山下 元三、柳田 学、竹立 匡秀、山田 聡、野崎 剛徳、北村 正博、村上 伸也
2. 発表標題 日本人における侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索
3. 学会等名 第60回 秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池上 久仁子、山下 元三、中村 友美、鈴木 美麻、西川 有彩、平沼 麻央、三木 康史、北垣 次郎太、柳田 学、北村 正博、村上 伸也
2. 発表標題 ヒト老化歯根膜細胞におけるmicro-RNA-34a SATB2を介した硬組織形成制御
3. 学会等名 第60回 秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山田 聡 (YAMADA SATORU) (40359849)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	村上 伸也 (MURAKAMI SHINYA) (70239490)	大阪大学・歯学研究科・教授 (14401)	
研究 分 担 者	北垣 次郎太 (KITAGAKI JIROUTA) (90570292)	大阪大学・歯学研究科・招へい教員 (14401)	